

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04530

研究課題名(和文) RNA送達を用いた生体リプログラミングによる1型糖尿病の根治法の開発

研究課題名(英文) Development of RNA therapies for curing of type 1 diabetes

研究代表者

松本 征仁 (Matsumoto, Masahito)

順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：90321819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病は、膵島に局在する膵細胞が破壊される結果、インスリンが枯渇し高血糖の所見を呈し、インスリン注射が不可欠となる重篤な糖代謝疾患である。代表者らが発明したダイレクトリプログラミングによる膵細胞の作製法は、超高効率かつ安全性が高い優れた技術である。この技術は細胞治療のみならず遺伝子治療にも臨床応用できると考えられる。本研究課題において、リプログラミング因子OKAPの導入によって、線維芽細胞などの体細胞からインスリンを強力に発現誘導することが観察された。in vivo DRモデルマウスにおいて、異所性のインスリン産生細胞が膵臓以外の臓器で顕著に検出され、本技術の有用性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表者らが発明したダイレクトリプログラミング(DR)による膵細胞を含む人工膵島の作製手法は、幹細胞を介さない体細胞へリプログラミング因子(OKAP)を導入すると、直接変換によって機能性膵細胞(iC)を約80%の効率で作出でき、さらに1型糖尿病モデルマウスの血糖改善効果を示すため、患者自身の体細胞を用いたex vivo細胞治療が可能である。さらに、mRNAを始めとする遺伝子治療開発に繋がり、従来の遺伝子・タンパク質補充療法とは異なり、患者体内において目的とする機能性インスリン産生細胞を作出できるため、画期的な次世代型の創薬モダリティとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Type 1 diabetes mellitus is a serious glucose metabolism disease that results from the destruction of pancreatic beta cells localized in pancreatic islets, leading to insulin depletion and hyperglycemia, making insulin injections essential. Our technology of producing pancreatic beta cells by direct programming is a promising with ultra-high efficiency and high safety. This technology is expected to be clinically applicable not only to cell therapy but also to gene therapy. In this research project, it was observed that introduction of the reprogramming factor OKAP strongly induced insulin expression from somatic cells such as fibroblasts, etc. In vivo DR model mice, ectopic insulin-producing cell cells were significantly detected in organs other than the pancreas, demonstrating a potential novel technology.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：再生医学

キーワード：分化転換 1型糖尿病 インスリン 体細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、生活習慣病の2型糖尿病とは異なり、膵島に局在する膵細胞が破壊される結果、インスリンが枯渇する結果として高血糖の所見を呈し、患者は連日のインスリン注射が不可欠となり、高血糖状態が続くと腎症・網膜症・神経疾患などの合併症を引き起こす重篤な糖代謝疾患である。現時点では1型糖尿病の根治は、未だ実現不可能であり、細胞(膵島)を再建・補充する方法が確立されていないからである。現在の1型糖尿病の治療法として、主にインスリン補充療法と膵島移植が行われているが、インスリン補充は、度重なる注射ならびに血糖管理の負担が大きい上に、過剰なインスリン投与が原因となり低血糖による昏睡状態に陥ることが臨床的に大きな問題である。一方、膵島移植はドナー不足や免疫応答による拒絶反応が起こるため、1回の移植でインスリン離脱ができないため対処療法に過ぎず、全ての1型糖尿病患者に満足いく治療を提供できないのが現状である。ヒトiPS細胞やES細胞等の幹細胞から膵細胞への最新誘導プロトコルが報告され(Meltonら Cell, Kiefferら Nat.Biotechnol.)、機能性膵細胞の分化誘導効率が約38%に達し、糖尿病の再生医療の実現に向け見通しが立ってきたといえる。しかしながら、このアプローチ法は下記5つの課題が残されており、これらの課題を克服しない限り1型糖尿病患者の根治は困難である。(1)造腫瘍性リスクの回避。(2)分化誘導効率。(3)膵細胞誘導の機序が不明。(4)膵島移植または幹細胞治療などの他家移植による免疫拒絶の回避。(5)血糖管理の負担からの解放(インスリン注射の代替法)

2. 研究の目的

上記の課題の克服するためには、インスリン注射による血糖管理の負担、ならびに膵島移植による免疫拒絶の回避など、患者家族にとって安全かつインスリン注射から離脱できる新たな治療法の開発が期待される。本研究は、1型糖尿病の根治開発を目指した生体内で核酸誘導ならびに直接変換を誘導する「細胞運命変換」治療の基盤研究、および細胞運命変換の分子機序の解明を目的としている。

3. 研究の方法

本計画において下記の手法によりダイレクトリプログラミング(DR)技術の有効性の評価の実施を行った。(1)mRNAを含む核酸導入によるin vitro細胞分化転換によるインスリン産生細胞の分化転換効率(定量PCR法, ELISAおよび免疫染色法)。LNP法によるリプログラミング因子OKAPを線維芽細胞やHEK293細胞などのヒト細胞へ導入し、RNA抽出後、cDNA合成ならびに定量PCR(qPCR)を実施。(2)生体内でDR技術を誘導できるin vivo DRモデルマウスの作出(遺伝子改変マウスの作出)。Doxycycline(Dox)誘導によってOKAP因子をマウス生体内で誘導できるDirect conversion(DIVER)システムを構築。(3)in vivo DRモデルマウス由来の細胞単離培養によるin vitro評価(定量PCR法および免疫染色法)。(4)in vivo DRモデルマウスの有効性評価(血糖値測定, ELISAおよび免疫組織学的解析)。Dox投与後、グルコメーターを用いて血糖値を測定。Streptozotocin(STZ)を尾静脈投与し1型糖尿病モデルマウスを作出。組織から抽出したRNAを用いてqPCR法によるインスリン発現の検出を実施。Dox誘導後の臓器を摘出し、4%PFA固定・包埋後、パラフィンブロックを剥切しスライドガラス上で抗インスリン抗体(DAKO社)を用いた免疫組織学的解析を実施。スライド切片は免疫蛍光組織染色後、DAPI染色を実施。

4. 研究成果

(1) LNP/mRNA 導入した線維芽細胞ならびに HEK293 細胞において、顕著な内在性インスリンの発現誘導を検出した。細胞内および培養上清中にインスリタンパクを免疫蛍光染色と ELISA 法によって検出。(2) *in vivo* DR モデル(OKAP)マウスを作出.PCR 法により 4 ラインにおいて transgene である OKAP 遺伝子を検出。(3) 4 ラインの尻尾由来の線維芽細胞を用いて Dox 処理を行ったところ DR(細胞内で OKAP mRNA を誘導)による内在性インスリン発現の最も高いラインを qPCR 法によって選定し、DIVER システムを確立した。(4) DIVER システムの特徴は、Dox 誘導をによって OKAP の遺伝子発現による細胞運命変換を人為的に誘導できる画期的な *in vivo* DR モデルである。Dox 処理によって OKAP の遺伝子の転写が誘導され、結果的にダイレクトリプログラミング誘導が可能となる。Dox は皮下または腹腔(i.p.)投与にて実施。STZ 投与による 1 型糖尿病モデルマウスを作出後、3 日以降血糖値上昇を確認したのちに、Dox 投与を実施。その結果、投与 9 時間において、膵島以外の異所性組織において、顕著な内在性のインスリンの発現が定量 PCR 法によって検出された。さらに、高血糖の改善効果が血糖測定によって観察された。特筆すべき点は、STZ 投与コントロール群の血漿インスリンは STZ 投与により 細胞が破壊されインスリン欠乏が起こるため、血漿中インスリンが検出されないのに対して、遺伝子治療群の血漿インスリンは顕著にインスリンが誘導されることが明らかとなった。以上より、*In vivo* における DR は即効性かつ持続的にインスリン産生細胞を作り出す画期的な方法であることが強く示された。従って本技術は、将来的に新たな遺伝子治療への臨床応用と血糖管理の負担に強いられる多くの 1 型糖尿病患者の救済実現に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitamura T, Tsugawa N, Ogasawara H, Matsumoto M, Itaka K, Okubo M, Yoda T, Suda T, Sato T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Vitamin D3 promotes not motor corrdination but motor skill learning without influence on mucle function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Nutri. Sci.Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe A, Tanaka A, Koga C, Matsumoto M, Okazaki Y, Kin T, Miyajima A	4. 巻 11
2. 論文標題 CD82 is a marker to isolate cell precursors from human iPS cells and plays a role for the maturation of cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 9530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88978-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura-Nakajima C, Sakaguchi K, Hatano Y, Matsumoto M, Okazaki Y, Tanaka K, Yamane T, Oishi Y, Kamimoto K, Iwatsuki K	4. 巻 22(16)
2. 論文標題 Ngn3-positive cells arise from pancreatic duct cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int.J.Mol.Sci.	6. 最初と最後の頁 8548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22168548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuoka Yuuri, Matsumoto Masahito, Yagi Ken, Okazaki Yasushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Evolutionary History of GLIS Genes Illuminates Their Roles in Cell Reprograming and Ciliogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 100 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msz205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohki Junko, Sakashita Akihiko, Aihara Eitaro, Inaba Akihiko, Uchiyama Hironobu, Matsumoto Masahito, Ninomiya Yuzo, Yamane Takumi, Oishi Yuichi, Iwatsuki Ken	4. 巻 84
2. 論文標題 Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 936 ~ 942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1713043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Anna, Watanabe Ami, Nakano Yasuhiro, Matsumoto Masahito, Okazaki Yasushi, Miyajima Atsushi	4. 巻 25
2. 論文標題 Reversible expansion of pancreatic islet progenitors derived from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 302 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Tsuyoshi, Iwata Takanori, Usui Michihiko, Kokabu Shoichiro, Sugamori Yasutaka, Takaku Yuki, Kobayashi Takashi, Ito Ko, Matsumoto Masahito, Takeda Shu, Xu Ren, Chida Dai	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone phenotype in melanocortin 2 receptor-deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 100713 ~ 100713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2020.100713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Ami, Tanaka Anna, Koga Chizuko, Matsumoto Masahito, Okazaki Yasushi, Kin Tatsuya, Miyajima Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 CD82 is a marker to isolate cell precursors from human iPS cells and plays a role for the maturation of cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9530,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88978-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩佐宏晃, 前田健吾, 堀岡希衣, 三宅克也, 松本征仁, 安田和基, 西村渉
2. 発表標題 膵島内における成熟膵 細胞のサブタイプとその局在の解析
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto M, Okazaki Y.
2. 発表標題 A novel approach for creating beta cells toward type 1 diabetes
3. 学会等名 European Endocrinology and Diabetes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto M, Nishimura K, Endo H, Okazaki Y
2. 発表標題 Cell Fate Reprogramming of Somatic Cells toward Type 1 Diabetes
3. 学会等名 シングルゲノミクス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto M, Endo H, Nishimura K, Okazaki Y
2. 発表標題 A novel approach for creating pancreatic islets toward type 1 diabetes based on neogenesis and pathogenic regeneration of beta cells
3. 学会等名 Cell Symposia
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Endo H, Matsumoto M, Nishimura K, Okazaki Y.
2. 発表標題 Screening Genes Promoting Direct Reprogramming from human somatic cells to pancreatic cells
3. 学会等名 Cell Symposia
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto M.
2. 発表標題 Role of vascular network in development and pathogenic regeneration of pancreatic endocrine cells.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤英樹 西村啓士郎 大久保桃絵 岡崎康司 松本征仁
2. 発表標題 膵内分泌細胞の分化促進機構の解明
3. 学会等名 先端モデル動物作製支援成果報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本征仁
2. 発表標題 体性幹細胞からの直接変換法による人工膵島作出の革新的技術開発
3. 学会等名 令和3年度再生・細胞治療・遺伝子治療研究開発交流会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahito Matsumoto
2. 発表標題 Development of a novel potential therapeutics towards type 1 diabetes
3. 学会等名 共同研究拠点ネットワークweb会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsumoto M, Itaka K, Okazaki Y.
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF A NOVEL CELL FATE CONVERTING MODEL TOWARDS FUNCTIONAL INSULIN-PRODUCING CELLS FROM ENDOCRINE PROGENITOR CELLS LINE TEC-3P AND SOMATIC CELLS
3. 学会等名 ISSCR(International Society for Stem Cell Research) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本征仁
2. 発表標題 体性幹細胞からの直接変換法による人工膵島作出の革新的技術開発
3. 学会等名 AMED 令和2年度再生・細胞治療・遺伝子治療研究開発交流会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安岡有理、松本征仁、八木研、岡崎康司
2. 発表標題 初期化因子GLIS1の進化的起源と祖先的役割
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本征仁、Deng Jia, 大久保正彦、水野洋介、佐藤毅、位高啓史
2. 発表標題 A novel mechanism of epigenetic control in MSC differentiation mediated by kinesin family 11
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 位高啓史, Chin-Yu Lin, 内田智士, 小牧祐司, 松本征仁, 片岡一則
2. 発表標題 mRNA医薬による治療用転写因子の送達と組織再生治療
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松本征仁	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)NTS	5. 総ページ数 270
3. 書名 ダイレクトリプログラミング 鈴木淳史編集 ダイレクトリプログラミングによる膵 細胞作出と1型糖尿病に対する機能再建(第10章) p93-108執筆担当	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヒト細胞におけるインスリン分泌能の定量方法	発明者 Endo H, Matsumoto M, Okazaki Y.	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-000268	出願年 2023年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 体細胞の直接分化転換方法	発明者 松本征仁、岡崎康司、萩原裕子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/042289	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡崎 康司 (Okazaki Yasushi) (80280733)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	
研究 分 担 者	位高 啓史 (Itaka Keiji) (60292926)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関